

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

Medicament for treating retrovirus infections containing phospholipase A2 from bee venom

Patent number: FR2722692
Publication date: 1996-01-26
Inventor: BOUSSEAU ANNE; HENIN YVETTE; RIEGER FRANCOIS
Applicant: RHONE-POULENC RORER GMBH (FR)
Classification:
- **international:** A61K35/64
- **european:** A61K38/46
Application number: FR19940008998 19940720
Priority number(s): FR19940008998 19940720

Abstract of FR2722692

Medicament for treatment and/or prevention of retrovirus infections comprises phospholipase A2 (PA2) from bee venom (BV). Also claimed are: (a) a composition comprising PA2 from BV optionally in association with a diluent or adjuvant, and (b) an association of PA2 from BV and an antiretroviral, antiviral, immuno-modulating or antimicrobial agent, and optionally excipients, for treating retroviral infections.

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 722 692

②① N° d'enregistrement national :

94 08998

⑤① Int Cl⁹ : A 61 K 35/64

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 20.07.94.

③① Priorité :

④③ Date de la mise à disposition du public de la
demande : 26.01.96 Bulletin 96/04.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : RHONE POULENC RORER SA
SOCIETE ANONYME — FR.

⑦② Inventeur(s) : BOUSSEAU ANNE, HENIN YVETTE et
RIEGER FRANCOIS.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire : RHONE POULENC RORER SA.

⑤④ **MEDICAMENT A BASE DE PHOSPHOLIPASE A2 DE VENIN D'ABEILLE.**

⑤⑦ Médicament destiné au traitement préventif et/ou cura-
tif des affections à rétrovirus caractérisé en ce qu'il com-
prend la phospholipase A2 de venin d'abeille.

FR 2 722 692 - A1



MEDICAMENT A BASE DE PHOSPHOLIPASE A2 DE VENIN D'ABEILLE

La présente invention concerne un médicament à base de phospholipase A2 de venin d'abeille destiné au traitement préventif et/ou curatif des affections à rétrovirus, et plus particulièrement du SIDA (syndrome d'immuno-déficience acquise) et de syndromes associés [ARC (AIDS related complex)].

Par prophylaxie nous sous-entendons le traitement des sujets qui ont été exposés aux virus HIVs (human immunodeficiency virus), en particulier les séropositifs asymptomatiques, qui présentent le risque de développer la maladie dans les mois et les années à venir après la primo-infection.

Les propriétés anti-inflammatoires et anti-rhumatismales du venin d'abeille sont connues. Le venin d'abeille comprend de nombreux constituants dans des teneurs variables, parmi lesquels des substances peptidiques comme par exemple l'apamine, la melittine, le peptide MCD... et des phospholipases parmi lesquelles la phospholipase A2, qui est présente à raison d'environ 12 %. L'apamine et la melittine ne possèdent pas d'activité antivirale.

Il a été montré que la phospholipase A2 de venin d'abeille possède une activité particulièrement intéressante sur rétrovirus et notamment sur virus HIV.

L'activité de la phospholipase A2 de venin d'abeille a été mise en évidence de la manière suivante :

Activité vis-à-vis de l'effet cytopathogène et de la production du virus HIV dans les lymphocytes

Cellules :

Le test est réalisé sur la lignée CEM 4, un sousclone enrichi en récepteurs CD4 obtenu à partir d'une lignée cellulaire lymphoblastoïde. Les cellules sont exemptes de mycoplasmes. Elles sont cultivées à 37°C sous une atmosphère contenant 5 % de gaz

carbonique, dans un milieu RPMI contenant 10 % de sérum de veau foetal, 100 UI/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 2 µg/ml de polybrene.

Virus :

- 5 On utilise la souche LAI de virus HIV-1. Les virus sont obtenus à partir de surnageants de cellules CEM clone 11 filtrés sur filtre de 0,45 µm. Les titres des préparations de HIV-1 sont de l'ordre de 10^4 CCID₅₀ (50 % de doses de cultures cellulaires infectées par ml).

Essai :

- 10 Les produits sont testés pour leur cytotoxicité et leur aptitude à inhiber l'effet cytopathogène induit par l'infection à HIV-1. Les essais sont mis en oeuvre dans une microplaque de 96 puits contenant des cultures tissulaires. On dépose en triple exemplaire : 25 µl/puits de chaque dilution de produit à tester dans du tampon phosphate isotonique (TPI) ou de TPI seul dans le cas des contrôles.
- 15 On ajoute alors 125 µl de la suspension de cellules CEM 4 (10^5 cellules par ml) et les microplaques sont incubées une heure à 37°C, sous une atmosphère contenant 5 % de gaz carbonique. Les cellules sont infectées avec 100 µl de suspension virale (100-200 CCID₅₀) et
- 20 cultivées pendant au moins 6 jours. Au bout de 6 jours d'incubation, 100 µl de surnageant sont prélevés pour la quantification de l'antigène viral p24 et 100 µl de cellules sont prélevés pour mesurer la viabilité cellulaire [déterminée selon une modification de la technique décrite par R. Pauwels et coll., J. Virol. Meth., 20,
- 25 309-321 (1988)]. On ajoute à ce prélèvement 10 µl d'une solution contenant 7 mg de MTT [bromure de 3-(4,5-diméthyl 2-thiazolyl)-2,5-diphényltétrazolium] par ml de tampon phosphate isotonique. Après 3 heures d'incubation à 37°C le surnageant est enlevé. Le MTT est converti en un sel de formazan (bleu) uniquement à
- 30 l'intérieur des cellules vivantes. On ajoute alors 100 µl d'isopropanol (contenant 0,04 mole/l d'acide chlorhydrique dans du propanol-2) et les microplaques sont agitées jusqu'à la solubilisation du bleu de formazan. L'absorbance à 540 nm est lue

avec un lecteur automatique de réactions Biotek EL-311 en microplaques. Cette absorbance est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. On étudie en parallèle la cytotoxicité des produits.

- 5 Le taux de protection (en %) d'un produit donné est déterminé à partir des densités optiques (DO) par la formule :

$$\frac{DO(\text{cell. traitées et inf.}) - DO(\text{cell. non traitées et inf.})}{DO(\text{cell. traitées et non inf.}) - DO(\text{cell. non traitées et inf.})}$$

La concentration inhibitrice 50 % est déterminée.

- 10 La quantification de l'antigène viral p24 se fait à l'aide d'un kit (NEK - 060B, Dupont, Wilmington USA) selon les instructions du fabricant.

Résultats :

2 dosages sont réalisés après 6 et 12 jours de traitement :

- 15 - détermination de la concentration inhibant 50 % de l'effet cytopathogène du virus (EC₅₀) et toxicité des produits (CC₅₀) ;
- concentration inhibant 50 % de la production virale (EC₅₀ Ag).

Toxicité	effet cytopathogène	production virale	
		J + 6	J + 12
CC ₅₀	EC ₅₀ (µg/ml)	EC ₅₀ Ag (µg/ml)	EC ₅₀ Ag (µg/ml)
15	0,25	0,25	2,5

- Les résultats démontrent que l'on obtient une diminution significative de l'effet cytopathogène et de la production virale à des concentrations non cytotoxiques.
- 20

La présente invention concerne également les compositions pharmaceutiques comprenant la phospholipase A2 de venin d'abeille éventuellement sous forme d'une association avec un ou plusieurs diluants ou adjuvants compatibles et pharmaceutiquement acceptables, ou avec un autre agent anti-rétrovirus, un agent antiviral, immunomodulateur ou antimicrobien.

Les compositions selon l'invention est capable de protéger de l'infection par le virus HIV, de réduire la progression vers le SIDA ou de diminuer sa gravité chez les sujets déjà infectés en réduisant la mortalité des cellules infectées. Les compositions peuvent être utilisées par voie parentérale ou rectale.

Les compositions peuvent être utilisées à titre curatif ou à titre préventif chez des sujets présentant une immunodéficience et/ou infectés par un virus HIV. Bien entendu, la constitution de ces compositions sera adaptée au cas particulier du tractus digestif des immunodéprimés.

Les compositions pour administration parentérale, peuvent être des solutions stériles ou des émulsions. Comme solvant ou véhicule, on peut employer le propylèneglycol, un polyéthylèneglycol, des huiles végétales, en particulier l'huile d'olive, des esters organiques injectables, par exemple l'oléate d'éthyle.

Ces compositions peuvent également contenir des adjuvants, en particulier des agents mouillants, isotonisants, émulsifiants, dispersants et stabilisants.

La stérilisation peut se faire de plusieurs façons, par exemple à l'aide d'un filtre bactériologique, par irradiation ou par chauffage. Elles peuvent également être préparées sous forme de compositions solides stériles qui peuvent être dissoutes au moment de l'emploi dans de l'eau stérile ou tout autre milieu stérile injectable.

Les compositions par administration rectale sont les suppositoires ou les capsules rectales, qui contiennent outre le principe actif, des

excipients tels que 1 beurre de cacao, des glycérides semi-synthétiques ou des polyéthylèneglycols.

En thérapeutique humaine, le médecin déterminera la posologie qu'il estime la plus appropriée en fonction d'un traitement préventif ou
5 curatif, en fonction de l'âge, du poids, du degré de l'infection et des autres facteurs propres au sujet à traiter. Généralement, les doses sont comprises entre 0,5 et 10 mg/kg par voie intra-veineuse ou sous-cutanée pour un adulte.

La présente invention concerne également les associations constituées
10 de la phospholipase A2 de venin d'abeille, et d'un autre principe actif connu pour son activité anti-rétrovirus, éventuellement en présence d'excipients pharmaceutiquement acceptables.

Les agents anti-rétrovirus pouvant être associés sont choisis parmi des agents compatibles et inertes vis-à-vis du dérivé du lupane de
15 formule générale (I). A titre non limitatif ces agents sont choisis parmi des inhibiteurs de la reverse transcriptase [zidovudine (AZT), didanosine (DDI), didéoxycytidine (DDC), TIBO, névirapine, PMEA, HEPT...], parmi des inhibiteurs de la protéase [comme par exemple le RO 31-8959].

20 L'exemple suivant illustre une composition selon l'invention.

Exemple

On prépare des ampoules contenant une solution dosée à 25 mg de phospholipase A2 de venin d'abeille en ajoutant 20 ml de soluté physiologique à 250 mg de phospholipase A2 de venin d'abeille. La
25 solution est divisée et répartie aseptiquement dans des ampoules de 2 ml. Chaque ampoule contient 25 mg de produit actif.

REVENDICATIONS

- 1 - Médicament destiné au traitement préventif et/ou curatif des affections à rétrovirus caractérisé en ce qu'il comprend la phospholipase A2 de venin d'abeille.
- 5 2 - Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend la phospholipase A2 de venin d'abeille éventuellement en association avec tout diluant ou adjuvant compatible et pharmaceutiquement acceptable.
- 10 3 - Association utile pour le traitement d'affections à rétrovirus comprenant la phospholipase A2 de venin d'abeille, et un agent anti-rétrovirus, un agent antiviral, immunomodulateur ou antimicrobien, éventuellement en combinaison avec des excipients compatibles et pharmaceutiquement acceptables.

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

2722692

**N° d'enregistrement
national**

FA 503481
FR 9408998

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	EP-A-0 309 602 (MUCOS PHARMA GMBH & CO) * page 3, ligne 7 - page 4, ligne 2 * ---	1-3
X	EP-A-0 471 549 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) * page 2, ligne 48 - page 4, ligne 12 * -----	1-3
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL.6)
		A61K C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
7 Avril 1995		Rempp, G
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite B : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		